

学 位 論 文 要 旨

氏名 島 (澤) 真理子

題 目 : 伴侶動物の腫瘍細胞診の精度向上のための基礎的研究

論文要旨:細胞診は、伴侶動物の腫瘍性疾患の非侵襲的診断法として重要な検査であり、臨床現場で日常的に実施される。一般的には乾燥塗抹標本のギムザ染色が用いられるが、精度が高い診断法とはいえない。非侵襲的な検査法により確定診断を導くことは獣医療の高度化のために必須であり、本研究では、伴侶動物の腫瘍細胞診の高度化に向けた以下の研究を行った。

1. 乾燥迅速パパニコロウ (rapid-air-dry-Papanicolaou; RAD-Pap) の有用性: Pap 染色は人の細胞診で主流の染色法であるが、湿固定が必要なため伴侶動物の細胞診ではほとんど使用されていない。そこで、乾燥標本に適用可能な迅速法である RAD-Pap 染色について伴侶動物細胞診への有用性を検討した。イヌとネコの腫瘍組織 (n=57) のスタンプ標本を用いて RAD-Pap 染色とギムザ染色を比較した。デジタル顕微鏡写真から腫瘍の悪性度評価に使われる12のパラメータについて定量解析を行った。RAD-Pap 染色は約15分と短時間で染色が完了し、細胞の分化度による細胞質の染色性の変化や核の微細構造の描出に優れていた。悪性腫瘍と良性腫瘍で比較すると、核小体の大きさによる悪性度評価に関しては RAD-Pap 染色の方が優位であるが、細胞や核の大きさと核/細胞質比による悪性度評価ではギムザ染色の方が優位であることが明らかになった。以上の結果から、伴侶動物の細胞診では RAD-Pap 染色はギムザ染色に代わる染色とは考えられなかった。しかしながら、細胞の分化度や核の評価に優れていることは事実であり、診断の補助ツールとしての有用性は高いと考えられた。

2. サイトケラチン、ビメンチンおよび S-100タンパクに対する迅速免疫染色法の開発:腫瘍細胞の由来を推定するための診断マーカーであるサイトケラチン(上皮系)、ビメンチン(間葉系)および S-100タンパク(神経系、メラノーマなど)について、細胞診標本での迅速免疫染色法を確立し臨床的有用性を検証した。はじめに、約60分でサイトケラチン、ビメンチンおよび S-100タンパクを検出する迅速酵素抗体法を開発した。イヌの腫瘍組織 (n=30) に本法を適用し、組織標本の免疫染色の結果との一致性(κ 係数)を評価した。その結果、30例中25例 (83.3%) で特異的なシグナルが検出され、特に間葉系腫瘍で組織

(別紙様式第 3 号)

標本の免疫染色と高い一致性($\kappa=0.857$)が認められた。次いで、サイトケラチンとビメンチンに対する迅速多重蛍光抗体法を検討した。その結果、短時間の染色(約45分)で一枚の細胞診標本から両分子を同時に検出できる診断法を開発することができた。本法の臨床的有用性を検証するため、イヌの腫瘍組織(n=9)および胸水(n=5)から作製した細胞診標本を用いて、迅速多重蛍光抗体法の結果を上述の迅速酵素抗体法による結果と比較した。その結果、迅速多重蛍光抗体法の感度と特異度は迅速酵素抗体法よりも高く、両分子の共発現細胞(中皮細胞)の鑑別も可能であった。さらに、迅速蛍光抗体法では、染色後のギムザ染色で細胞の形態観察が可能であった。今回開発した両方法は、診断施設の機器や診断者の経験に応じて使い分けることができ、細胞診で腫瘍細胞の由来を同定するための診断法として高い実用性と有用性をもつと考えられた。

3. リンパ球免疫表現型の分類のための迅速多重蛍光抗体法:腫瘍性リンパ球の免疫表現型の鑑別は、予後判断や治療計画の立案に重要であるが、通常のギムザ染色標本ではこの推測が困難である。そこで、一般的な細胞診標本でリンパ球の免疫表現型を鑑別するための迅速多重蛍光抗体法を確立し、臨床的有用性を検証した。その結果、約45分と短時間で染色が完了し、一枚の細胞診標本から CD3(T細胞)とCD79 α (B細胞)を同時に検出できる迅速多重蛍光抗体法を開発することができた。本法をイヌとネコの細胞診標本へ適用し、遺伝子クローナリティ解析との比較およびリンパ腫を鑑別するための占有細胞のカットオフ値の算出(ROC解析)を行った。その結果、遺伝子クローナリティ解析との一致率は93.5%(29/31)と高かった。さらに、リンパ球増殖性疾患と診断された臨床標本40例でのROC解析から、リンパ腫と非リンパ腫を分ける特定細胞数(CD3またはCD79 α 陽性細胞)の占有率のカットオフ値は87.5%であった。本法は、イヌとネコのリンパ増殖性疾患の非侵襲的診断法として高い実用性と有用性をもつと考えられた。

以上、本研究では伴侶動物の細胞診を高度化のために、RAD-Pap染色の有用性および迅速免疫染色法の開発と有用性について様々な検索を行った。特に迅速免疫染色法の有用性は高く、伴侶動物の細胞診に分子レベルでの根拠を与える実用性の高い診断法であると考えられた。

学位論文審査の結果の要旨

氏名	島 真理子
審査委員	主査：鹿児島大学 准教授 矢吹 映
	副査：鹿児島大学 教授 大和 修
	副査：鳥取大学 教授 保坂 善真
	副査：鹿児島大学 教授 遠藤 泰之
	副査：鹿児島大学 准教授 三浦 直樹
題目	伴侶動物の腫瘍細胞診の精度向上のための基礎的研究
審査結果の要旨： 細胞診は非侵襲的な腫瘍の診断法としてイヌとネコの臨床現場でも汎用されている。しかしながら、一般的なギムザ染色のみでは確定診断を得ることは難しい。本論文は、イヌとネコの腫瘍細胞診を高度化することで非侵襲的な確定診断に近づけるための基礎的研究であり、論文は以下の3つの章で構成されている。 第一章では、人医学の細胞診で主流のパパニコロウ染色に着目し、イヌとネコの細胞診への応用について検討を行った。染色には、乾燥固定標本で実施可能な乾燥迅速パパニコロウ染色 (RAD-Pap) を採用した。イヌとネコの腫瘍組織 (n=57) のスタンプ標本を用いて RAD-Pap 染色とギムザ染色を比較した。その結果、RAD-Pap 染色はギムザ染色に比べて細胞の分化度や核の微細構造の評価に優れていた。悪性度評価のための 12 のパラメータについて統計的に解析すると、核小体の大きさによる評価は RAD-Pap 染色の方が優位であるが、細胞や核の大きさと核/細胞質比による評価ではギムザ染色の方が優位であった。以上の結果から、伴侶動物の細胞診では RAD-Pap 染色はギムザ染色にとって代わる染色ではないと考えられた。しかしながら、細胞の分化度や核の評価には優れており、診断の補助ツールとしての有用性は高いと考えられた。 第二章では、腫瘍細胞の由来同定に有用な中間径フィラメント (サイトケラチン、ビメンチン) および S-100 タンパクについて、イヌとネコの細胞診で実施できる迅速免疫染色法を開発し、その臨床的有用性を評価した。はじめに迅速酵素抗体法を作製し、次いで迅速多重蛍光抗体法を開発した。迅速酵素抗体法は、固定法や抗体の濃度反応時間の検討からはじめ、抗原賦活化処理や洗浄法などについても検討した。結果として、約 60 分で完了する迅速酵素抗体法を開発することができた。確立した迅速酵素抗体法の臨床的有用性を検証するため、イヌの	

(別紙様式第 10 号)

腫瘍組織 (n=30) を用いて細胞診の迅速酵素抗体法と組織標本の免疫染色の診断結果を比較した。両者の一致性は κ 係数により統計学的に評価した。その結果、迅速酵素抗体法では 30 例中 25 例 (83.3%) において特異的なシグナルが検出され、細胞診標本と組織標本との一致性は上皮系腫瘍では中等度、非上皮系腫瘍では高度と判定された。迅速多重蛍光抗体法は、抗サイトケラチン・マウスモノクローナル抗体、抗ビメンチン・ラビットモノクローナル抗体、Alexa 標識二次抗体を用いて開発した。上記同様、染色手技を検討し、約 45 分で完了する迅速多重蛍光抗体法を開発することができた。本法により、一枚の細胞診標本からサイトケラチンとビメンチンを同時に検出することが可能となった。本法の臨床的有用性を検証するために、イヌの腫瘍組織 (n=9) および胸水 (n=5) から作製した細胞診標本について、迅速多重蛍光抗体法の結果を上述の迅速酵素抗体法による結果と比較した。その結果、迅速多重蛍光抗体法では、すべての細胞診標本で特異性の高いシグナルが検出され、迅速酵素抗体法で強い非特異反応を示した症例でも診断が可能であった。また、胸水の沈渣塗抹標本では、サイトケラチンとビメンチンを共発現する中皮細胞の鑑別を行うこともできた。今回開発した二つの方法を比べると、診断の精度の面では迅速多重蛍光抗体法に優位性があるが、特別な器機および診断者の熟練度が不要という点では迅速酵素抗体法に優位性があった。

第三章では、イヌおよびネコの細胞診標本からリンパ球の免疫表現型を鑑別するための迅速多重蛍光抗体法を確立し、その臨床的有用性を検証した。はじめに、抗 CD3・ウサギポリクローナル抗体、抗 CD79 α ・マウスモノクローナル抗体および Alexa 標識二次抗体を用いた迅速多重蛍光抗体法の開発を試みた。イヌの正常リンパ節の凍結標本を用いて、固定液、抗原賦活化処理、抗体の濃度およびカクテル化などの各種条件を検討した。次いで、確立した迅速多重蛍光抗体法を臨床標本へ適用した。迅速多重蛍光抗体法によって決定したリンパ腫の免疫表現型は遺伝子クローナリティ解析の結果と比較し、さらに、Receiver Operating Characteristic (ROC) 解析を用いてリンパ腫と非リンパ腫を鑑別するための占有細胞のカットオフ値を算出した。各種条件検討の結果、ホルマリン固定を行うことで一枚の細胞診標本から約 45 分で CD79 α 陽性 B 細胞と CD3 陽性 T 細胞を同時に検出する迅速多重蛍光抗体法を開発することができた。次いで、本法と遺伝子クローナリティ解析の結果を比較すると、リンパ腫症例の 93.5% (29/31) で結果が一致した。さらにリンパ球増殖性疾患と診断された臨床標本 37 例で行った ROC 解析では、リンパ腫と非リンパ腫を分ける特定細胞数 (CD3 あるいは CD79 α 陽性細胞) の占有率のカットオフ値は 87.5% と算出された。以上の結果から、開発した CD3 と CD79 α の迅速多重蛍光抗体法は、イヌとネコのリンパ増殖性疾患の非侵襲的診断法として有用性が高いと考えられた。

本論文は、適正な手法で実験が行われており、客観性のある科学的なデータが多く集積されていた。得られたデータは統計学的手法を用いて正しく解析されており、結果の意味するところも最新の文献を多数引用しながら適切に考察されていた。

以上により、本論文は博士 (獣医学) の学位に十分に値すると判断した。